

To:

.

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION

PCT

111

(PCT Rule 61.2)

Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT

Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

	ETATO-ONIO D'AINIENIQUE	0.7
Date of mailing (day/month/year) 15 May 2000 (15.05.00)	in its capacity as elected Office Applicant's or agent's file reference 983017 1PC Priority date (day/month/year)	
International application No. PCT/CN99/00139		;
International filing date (day/month/year) 06 September 1999 (06.09.99)	Priority date (day/month/year) 22 September 1998 (22.09.98)	
Applicant YU, Long et al		

1.	The designated Office is hereby notified of its election made:	
	X in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:	
	20 April 2000 (20.04.00)	
	in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:	
		
2.	The election X was	
	was not	
; ;	made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).	
<u>.</u> :		
į		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Pascal Piriou

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Coldsi

THIS PAGE BLANK USIND

REC'D 1 4 JUN 2000

WIPO PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

	ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Form PCT/IPEA/416)
International application No International filing PCT/CN99/00139 6.September 1999(06)	date (day/month/year) Priority date (day/month year) 09.99) 22.September 1998(22.09.98)
International Patent Classification (IPC Int.Cl ⁶ :C12N15/12.C07K14/475,C12N15/64,C12N1/13,C12P21/02	
Applicant YU,Long. et al.	
This international preliminary examination report has been p	repared by this International Preliminary Examining Authority and
is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of3 sheets	s, including this cover sheet.
	eets of the description, claims and /or drawings which have been
	containing rectifications made before this Authority (see Rule
70.16 and Section 607 of the Administrative Instruction	ins under the PC1).
These annexes consist of a total of sheets.	
3. This report contains indications relating to the following iter	ns:
I X Basis of the report	
II priority	
III Non-establishment of opinion with regard to novel	ty ,inventive step and industrial applicability
IV Lack of unity of invention	
V X Reasoned statement under Article 35(2) with regard citations and explanations supporting such stateme	I to novelty ,inventive step or industrial applicability:
VI Certain documents cited	
VII Certain defects in the international application	
Certain observations on the international opplication	on.
Date of submission of the demand	Date of completion of this report
20.April 2000(20.04.00)	31.May 2000 (31.05.00)
Name and mailing address of the IPEA/CN 6Xitucheng RDJimen Bridge.Haidian District.Beijing.100088 China	Authorized officer ZENG,Fanhui
Facsimile No.86-10-62019451	Telephone No.86-10-62093733.
Form PCT/IPEA/409(cover sheet)(July 1998)	\ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \





Ι.	Ba	asis of the report
1.	With	regard to the elements of the international application:*
	$\overline{\mathbf{x}}$	the international application as originally filed
	\equiv	the description:
	ш	pages, as originally filed
		pages, filed with the demand
		pages, filed with the letter of
	\Box	the claims:
		pages as originally filed
		pages, as amended (together with any statement) under Article 19
		pages
	_	pages, filed with the letter of
	Ш	pages as originally filed
		pages, filed with the demand
		pages, filed with the letter of
	П	the sequence listing part of the description:
		pages, as originally filed
		pages, filed with the demand
		pages, filed with the letter of
	_	to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the
ntern		al application was filed, unless otherwise indicated under this item.
	T	hese elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:
		the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1 (b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and / or 55.3).
2.	With	regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international
	prei	iminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:
	₩	contained in the international application in written form.
	씜	filed together with the international application in computer readable form.
	H	furnished subsequently to this Authority in written form.
	吕	furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
	H	The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international
	ш	application as filed has been furnished.
		The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.
3.	П	The amendments have resulted in the cancellation of:
	ш	the description, pages
		the claims, Nos
		the drawings, sheets/fig
A		This report has been established as if (some of)the amendments had not been made, since they have been considered to go
4.		beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**
	in this	cement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to s report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments(Rules 70.16 and 70.17). placement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.



application

No.

Inventive step (IS)	V .	Reasoned statement under Article 3 citations and explanations support	35(2)with regard to noveling such statement	ty, inventive step or industrial app	olicability;
Inventive step (IS) Claims Claims I-14 YES Claims Industrial applicability (IA) Claims Claims I-14 YES Claims N 2. Citations and explanations (Rule 70.7) The indispensable technical features involved in claim 1-14 have not been searched in the prior art, and these indisperent decentions of the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step industrial applicability.	1.	Statement			
Industrial applicability (IA) Claims 1-14 YES Claims N 2. Citations and explanations (Rule 70.7) The indispensable technical features involved in claim 1-14 have not been searched in the prior art, and these indisperent are not obvious relative to the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step industrial applicability.		Novelty (N)			
Claims 2. Citations and explanations (Rule 70.7) The indispensable technical features involved in claim 1-14 have not been searched in the prior art, and these indisperent features are not obvious relative to the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step industrial applicability.		Inventive step (IS)			
The indispensable technical features involved in claim 1-14 have not been searched in the prior art, and these indispendent of the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step industrial applicability.		Industrial applicability (IA)			
echnical features are not obvious relative to the prior art and able to apply in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step in industry. So claim 1-14 are novelty, inventive step industry.	2.	Citations and explanations (Rule 70.7	7)		
		cal features are not obvious relative to			
				•	





专 利 合 作 条 纟

PCT

国际初步审查报告

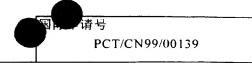
(PCT 条约 36 和细则 70)

REC'D 14	JUN 2000
WIPO	PCT

中请人或代理人的档案号			
983017 1PC	关于后续行为	参见"传送国	际初步审查报告的通知"(PCT/IPEA/416 表)
国际中请号	国际申请日(日/月	1/年)	优先权日 <i>(日/月/年)</i>
PCT/CN99/00139	6.9 月.199	9(06.09.99)	22.9 月.1998(22.09.98)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 I	PC 两种分类		
Int.Cl ⁶ : C12N15/12,	C07K14/475,	C12N15/64	,C12N1/13 , C12P21/02
中请人			
	余力 	艺,等	
1. 本国际初步审查单位已作出国际	初步审查报告并依		·
2. 本报告共计	包括扉页。		
□ 本报告还有附件,即修改后	的并且作为本报告	基础的说明书	修改页、权利要求书修改页和/或附图修改
页,和/或对本国际初步审	查单位所作出的更正	E页(见 PCT 细	l则 70.16 和行政规程 607)。
这些附件共计页			
3. 本报告包括关于下列各项的内容	:		
1 🔽 报告的基础			
II 【】 优先权			
── Ⅲ □ 不作出关于新颖性、创	造性和工业实用性的	的意见	
IV ∰ 缺乏发明的单一性			
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	生、创造性或工业实	用性的推断性	意见:支持这种意见的引证和解释
VI			
VII 🔲 国际申请中的某些缺陷			
VIII 对国际中请的某些意见			
提交要求书的日期 		完成本报告的	5日期
20.04 月.2000(20.04.0	00)		2000年5月31日(31,05、い)
国际初步审查单位名称和地址		受权官员	
中国知识产权局专利局 100088 中国北京市海淀区蓟门桥西:	上城路 6 号		曾繁辉
传真号: 010 - 6201945		电话号码:	62093733

THE PAGE BLANK USPRO





1.	报告的基	基础			
1.	关于国际	申请中各个	部分: *		
	$\overline{\mathbf{x}}$	原始提交的	的国际申请。		
		说明书,	第页		
			第页		
				,随	的信件提交的。
		权利要求,			
				,按条约第 19 条修改的(附有	了说明) ,
			第项		
				,随	的信件提交的。
		附图,	第页,原始提交的		
			第_页, 随要求书提交的		- >-//
	_			的信件提	是交的。
			的序列表部分	D. 40 -2-44.	
			页,原始要求		
			页,随要求		48 × 60
		界	贝,	的信件	逆 文的。
2.	关于所使	用的语言,	除本项下另有说明外,本门	国际初步审查单位所获得的或	者已向本国际初步审查单位提交
			听使用的语言均为提交本国		
	本国际初]步审查单位	立所获得的或向本国际初步	审查单位提交的这些部分所使	用的的语言是,
	这种语言				
				语言(细则 23.1 (b))。	
			青公布时所使用的语言(细		
		为了国际礼	刃步审查而提交的译本所使	用的语言(细则 55.2 和/或 55.	3)。
3.	关丁本国	际申请中所	f公开的任何 核甙酸和/或氨	【基酸的序列 ,本国际初步审查	是根据下面的序列表进行的:
	$\overline{\mathbf{z}}$		中所包含的书写形式的序列	,	
			青同时提交的计算机可读形		
			写形式向本国际初步审查单		
		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	算机可读的形式向本国际初		
	님			序列表没有超出原始提交的国	
		已提交了是	关于以计算机可读的形式记	载的信息是与书写形式的序列	表相问的说 明。
4.	修改删除	了以下内容	6的:		
		说明书,	第页		
		权利要求,	,第项		
		附图,	第页,图	_	
					发告是按照如同没有修改的情况作
],					
	出席	的(细则 70.20	(c))。 **		
	Literary de en e	···	No. 400 104 plus 107 will 107 407 when 444 444 444 177	· 小小科科在西部边址 《压杯科 ·	67.
*				、在本报告中被称为"原始提交 〔和 70.17 〕	的 , 及宫宙探贝尔耳为
			它们没有包含修改(细则 70.16 * # 23		
**	住門包含な	这种珍以的智	替换页,都必须在第1项中指5	劝,并形为争拟宣的附件。	



THIS PACE BLANK USPIO



_				
A.	国	水 华	请	号
				DC 7

PCT/CN99/00139

按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见;支持这种意见的引证和解释				
意见				
新颖性(N)	权利要求	1-14	足	
	权利要求			
创造性(IS)	权利要求	1-14	足	
	权利要求			
工业实用性(IA)	权利要求	1-14	足	
	权利要求		·	

2. 引证和解释 (细则 70.7)

权利要求 1 - 14 所涉及的必要技术特征没有在现有技术中被检索到,而且这些必要技术特征相对于现有技术是非显而易见的,并能在工业上应用。因此权利要求 1 - 14 具有新颖性,创造性和工业实用性。



₹,

THE STATE OF SHIP OF S



From the

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

т.

Xu Xun

Shanghai Patent & Trademark Law Office

Guiping Road 435, Shanghai 200233

P.R.China

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing

(day/month/year)

08.06.00

Applicant's or agent's file reference

983017 1PC

DIPORTANT NOTIFICATION

International application No.

international filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year)

PCT/CN99/00139

06.09.99

22.09.98

Applicant

YU, Long, et al.

- The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith th international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
- 2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
- 3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of th report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of th PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/

Authorized officer

The Chinese Patent Office

(IPEA/CN)

Tel. 62093733

Form PCT/IPEA/416 (July 1992)

THIS PASE BLANK USPRO

ALTIC ORCH DIM LIBOTO



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

983017 1PC				
International application No. International filing of	late (day/month/year) Priority date (day/month/year)			
	22.09.98			
International Patent Classification (IPC) or national classification ar	MIPC			
	14/475, C12N15/64,C12N1/13, C12P 21/02			
Applicant YU, Long, et al.				
This international preliminary examination report has be and is transmitted to the applicant according to Article	een prepared by this International Preliminary Examining Authority 36.			
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including	this cover sheet.			
, – , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	sheets of the description, claims and/or drawings which have d/or sheets containing rectifications made before this Authority ative instructions under the PCT).			
These annexes consist of a total of sheets.				
This report contains indications relating to the following items:				
I ⊠ Basis of the report				
II 🗆 Priority				
III Non-establishment of opinion with regard				
IV 🗆 Lack of unity of invention				
V ⊠ Reasoned statement under Article 35(2) w citations and explanations suporting such	ith regard to novelty, inventive step or industrial applicability; statement			
VI Certain documents cited				
VII Certain defects in the International applica	tion			
VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand Date of completion of this report				
20.04.2000	May 31, 2000			
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:	Authorized officer			
The Chinese Patent Office	Telephone No. 62093733			

Form PCT/409 (cover sheet)



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



Int mational application No. PCT/CN99/00139

I. Bas	is of	the	report
--------	-------	-----	--------

- 1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):
- 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this IPER was drawn on the basis of the sequence listing:
 - Solution contained in the international application in printed form

-

THIS PAGE BLANK (USPTON

THIC DE COMMUSERD







International application No. PCT/CN99/00139

(:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inv ntive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)

Yes: No: Claims Claims 1-14

Inventive step (IS)

Yes: Claims No: Claims 1-14

Industrial applicability (IA)

Yes: No:

Claims Claims 1-14

2. Citations and explanations

The essential technical features of Claims 1-14 have not been searched in the prior art.

Moreover, these technical features are not obvious when compared with the prior art, and have industrial applicability. Therefore, Claims 1-14 possess novelty, inventiveness and industrial applicability.

THE PAGE BLANK WENTON

发信人: 国际初步审查单位

收信入:

200233

上海市桂平路 435 号知识产权大楼 上海专利商标事务所

徐迅

PCT

传送国际初步审查报告通知书

(PCT 细则 71.1)

发文日

(日/月/年) 08. 6月 2000 (08.06.00)

申请人或代理人的档案号

983017 IPC

重要通知

国际申请号

国际申请目

优先权日

PCT/CN99/00139

(日/月/年)6.9 月.1999(06.09.99)

(日/月/年) 22.9 月.1998(22.09.98)

申请人

余龙,等

- 1. 通知申请人,本国际初步审查单位随本通知传送对国际申请制定的国际初步审查报告及其附件(如果有 附件的话)。
- 2. 报告及其附件(如果有附件的话)的副本同时送交国际局,以便送达所有选定局。
- 3. 任何选定局提出要求时,国际局将作出报告的英文译文(但不是任何附件的译文),并将该译文传送 给这些选定局。
- 4. 提示

在自优先权日起 30 个月内(或者在有些局更迟)申请人必须完成一定的行为(提交译本和缴纳国 家费)进入各选定局的国家阶段(条约第39条(1))(参见国际局寄送的PCT\IB\301表所附 的提示)。

国际申请的译本必须向选定局提供时,该译本还必须包括国际初步审查报告附件的译文。作出并直 接向各有关选定局提供该译文是申请人的责任。 何炯年 _ 100年6月 12日

有关各选定局适用的期限和要求的详情,参见PCT申请人指南第Ⅱ卷。

卡塞亚目的祝宴采所

国际初步审查单位名称和地址

中国专利局

100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6号

传真号: 62019451

受权官员

电话号码:





专利合作条约

PCT

国际初步审查报告 (PCT 条约 36 和细则 70)

申请人或代理人的档案号		1				
983017 1PC 关于后续行为	关于后续行为 参见"传送国际初步审查报告的通知"(PCT/IPEA/416 表)					
国际申请号 国际申请日(日/)	月/年)	优先权日 <i>(日/月/年)</i>				
PCT/CN99/00139 6.9 月.199	99(06.09.99)	22.9 月.1998(22.09.98)				
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类						
Int.Cl ⁶ : C12N15/12, C07K14/475	,C12N15/64,C12	N1/13 , C12P21/02				
申请人 余龙,等						
1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依	照条约第 36 条将其·	———————————————————— 传送给申请人。				
2. 本报告共计 3 页,包括扉页。						
-	までいかぶら 明 北 秋 みそろ	· 如利無式分格改革和常胜网络改				
□ 本报告还有附件,即修改后的并且作为本报告						
页,和/或对本国际初步审查单位所作出的更	正贝(光 PCT 细则 /0.	.16 和仃以规程 607)。				
这些附件共计页	e.	•				
3. 本报告包括关于下列各项的内容:						
I ▼ 报告的基础		•				
II / 优先权						
III	的音见					
,	11.65.7C					
	IV					
V 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见;支持这种意见的引证和解释						
VI 引用的某些文件						
VIII	•	,				
提交要求书的日期						
20.04 月.2000(20.04.00)		2000年5月31日(31、05、00)				
国际初步审查单位名称和地址 中国知识产权局专利局 100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 传真号: 010 - 62019451	受权官员 曾 第 电话号码: 6209	譯 第一字 13733				







PCT/CN99/00139

I.	报告的基础						
1.	1. 关于国际申请中各个部分: *						
	反 原始提	交的国际申请	Ī.	•.			
	□ 说明书	,第	页,	按原始提交的,			
		第	页,	随要求书提交的	约,		
		第	页,	随			
	□ 权利要		项,				
					修改的(附有说明),		
	74.60						
	附图,		_页,原始提交的, 随要求书提交的,				
					的信件提交的。		
	□ 说明书	~~——— 5中的序列表部					
			页,原始要求	提交的,			
	第		页,随要求书				
	第				的信件提交的。		
2	关于所使田的语言	· 险太佰下!	显有说明外 太国	际初先审查单位	z 所获得的或者已向本国际初步审查单位提交		
			方有说例为,华昌 言均为提交本国阿				
					这些部分所使用的的语言是 ,		
	这种语言是				,		
	□ 为了国际	示检索而提交	的译本所使用的语	语言(细则 23.1	(b)).		
	□ 本国际□	申请公布时所	使用的语言(细则	月48.3 (b))	9		
	□ 为了国际	示初步审查而	提交的译本所使用	目的语言(细则:	55.2 和/或 55.3)。		
.3.	关于本国际申请中	1所公开的任何	可核甙酸和/或氨基	基酸的序列,本[国际初步审查是根据下面的序列表进行的:		
	☑ 国际申请中所包含的书写形式的序列表 。						
	与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列表。						
	后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列表。						
	后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列表。						
	□ 己提交了关于后来提交的书写形式的序列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。						
	□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □	「天士以 <u>计算</u>	机可读的形式记载	7的信息是与书与	写形式的序列表相同的说明。		
.4.	修改删除了以下内				·		
	── 说明书。		页		<i>'</i>		
i !	■ 权利要:	求,第	项				
•	附图,	第	页,图				
5.	由于(某些)	修改被认为超	出了原始公开的范	」 围,如补充栏所	示,因此本报告是按照如同没有修改的情况作		
	— 出的(细则 70	.2(c)), **					
	22,13(77,73)	(-)//					
*	按照条约第 14 条答	复通知时向受5	理局提交的替换页,	在本报告中被称	为"原始提交的",这些替换页不作为		
	本报告的附件,因为它们没有包含修改(细则 70.16 和 70.17)。						
**	** 任何包含这种修改的替换页,都必须在第1项中指明,并作为本报告的附件。						
					,		







PCT/CN99/00139

意见		•	
新颖性(N)	权利要求	1-14	
	权利要求		
创造性(IS)	权利要求	1-14	是
	权利要求	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
工业实用性(IA) 权利要求	权利要求	1-14	是
	权利要求		否

2. 引证和解释 (细则 70.7)

权利要求1-14所涉及的必要技术特征没有在现有技术中被检索到, 而且这些必要技术特征相对于现有技术是非显而易见的,并能在工业上应 用。因此权利要求1-14具有新颖性,创造性和工业实用性。



PCT



世界知识产权组织



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号6:

C12N 15/12, C07K 14/475, C12N 15/64, 1/13, C12P 21/02

(11) 国际公布号:

WO00/17351

A1

(43) 国际公布日:

2000年3月30日(30.03.2000)

(21) 国际申请号:

PCT/CN99/00139

(22) 国际申请日:

1999年9月6日(06.09.1999)

(30) 优先权:

98119758.2

1998年9月22日(22.09.1998)

CN

(71)(72) 发明人/申请人: 余龙(YU, Long) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码:200433, Shanghai (CN)。

(72) 发明人;及

- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 张宏来(ZHANG, Honglai) [CN/CN]; 傅强(FU, Qiang) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所,邮政编码:200433, Shanghai (CN)。赵勇(ZHAO, Yong) [CN/CN]; 中国上海市曹杨八村181号402室,邮政编码:200062, Shanghai (CN)。屠强(TU, Qiang) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所,邮政编码: 200433, Shanghai (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路 435号, 邮政编码:200233, Shanghai (CN)。

(81) 指定国:

AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

包括国际检索报告。

- (54) Title: NEW HUMAN HEPATOMA-DERIVED GROWTH FACTOR ENCODING SEQUENCE AND POLYPEPTIDE ENCODED BY SUCH DNA SEQUENCE AND PRODUCING METHOD THEREOF
- (54) 发明名称: 新的人肝癌细胞衍生生长因子编码序列、其编码的多肽及制备方法
- (57) Abstract

The invention provides a cDNA sequence of a new type II human hepatoma derived growth factor(HDGF2). The protein encoded by such sequence is a homology of type I HDGF. The present invention also relates to peptides encoded by the nucleotide sequences, to uses of these polynucleotides and the polypeptides, and methods for producing the said polynucleotides and the polypeptides.



(57) 摘要

本发明提供了一种新的II型人肝癌细胞衍生生长因子(HDGF2)的cDNA序列,该蛋白是I型HDGF的同系物.本发明还涉及由该核苷酸序列编码的多肽,这些多核苷酸和多肽的应用,以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法.

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AE	阿拉伯联合省长国	DK	丹麦	КР	朝鲜民主主义人民共和国	RO	罗马尼亚
ΑG	安投瓜和巴布亚	DM	多米尼加	KR	韩国	RU	俄罗斯联邦
AL	阿尔巴尼亚	DZ	阿尔及利亚	KZ.	哈萨克斯坦	SD	苏丹
AM	亚 美尼亚	EE	爱妙尼亚	LC	圣户西亚	SE	瑞典
AT	奥地科	ES	西班牙	LI	列支敦士登	SG	新加坡
ΑU	澳大利亚	FI	芬兰	LK	斯里兰卡	SI	斯洛文是亚
٨Z	阿塞拜疆	FR	法国	LR	利比重亚	SK	斯洛伐克
BA	波斯尼亚-黑塞哥维那	GA	加蓬	LS	莱索托	SL	塞拉里昂
BB	巴巴多斯	GB	英国	LT	立胸宛	SN	塞内加尔
BE	比利时	GD	格拉纳达	LU	卢森堡	SZ	新成士兰
BF	布圣纳法索	GE	格鲁吉亚	LV	拉托维亚	TD	年得
BG	保加利亚	GH	加纳	MA	摩洛哥	TG	多哥
BJ	贝宁	GM	冈比亚	MC	摩纳哥	LT	塔吉克斯坦
BR	巴西	GN	几内亚	MD	摩尔多瓦共和国	TM	土岸曼斯坦
BY	白俄罗斯	GR	希腊	MG	马达加斯加	TR	土耳其
CA	加拿大	GW	几内亚比绍	MK	前南斯拉夫马其顿共和国	TT	特立尼达和多巴哥
CF	中非共和国	. HR	克罗地亚	ML	马里	TZ	坦桑尼亚
CG	刚果	HU	匈牙利	MN	蒙古	UA	乌克兰
CH	理士	1D	印度尼西亚	MR	毛里塔尼亚	UG	乌干达
CI	科特迪瓦	IE	爱尔兰	MW	马拉维	US	英国
CM	喀麦隆	IL	以色列	MX	墨西哥	UZ	乌兹别克斯坦
CN	中国	. IN	印度	NE	尼日尔	VN	越南
CR	哥斯达黎加	IS	冰岛	NL	荷兰	YU	附斯拉夫
CU	古巴	rr '	意大利	NO	郵政	ZA	南非
CY	塞補路斯	. JP	日本	NZ	新西兰	zw	洋巴布韦
CZ.	捷克共和国	KE	肯尼亚	PL	被盖		
DE	德国.	KG	吉尔吉斯斯坦	PT	葡萄牙		



新的人肝癌细胞衍生生长因子编码序列、 其编码的多肽及制备方法

发明领域

5

10

本发明涉及基因工程领域,具体地,本发明涉及一种新的人基因核苷酸序列。更具体地说,本发明涉及新的II型人肝癌细胞衍生生长因子(HDGF2)的cDNA序列,该蛋白是I型HDGF的同系物。本发明还涉及由该核苷酸序列编码的多肽,这些多核苷酸和多肽的应用,以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。

背景技术

研究已表明,细胞生长的调节是通过各种细胞因子与其特异的膜表面受体作用后引发的一系列级联反应实现的。在肿瘤细胞中,某些级联反应的失控致使细胞持续增殖。在肝癌细胞中,人们已经发现一些自分泌和旁分泌细胞因子(Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2448-2452, 1986; Proc. Natl. Acad. Sci. 86:7432-7436, 1989; Cell 61:1137-1146, 1990)。肝癌细胞衍生生长因子(HDGF)是在无血清培养的人肝癌细胞株系HuH-7中找到的一个细胞因子,它具有肝素结合能力并能刺激Swiss 3T3细胞的DNA合成(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994)。

1989年Nakamura等人首次从HuH-7细胞中部分纯化并鉴定了HDGF(Clin. Chim. Acta. 183:273-284, 1989), 1994年该实验组又完整克隆了HDGF的cDNA序列(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994), 1997年该实验组在小鼠中找到了HDGF的同系物并发现了该基因家族的另两个成员HRP-1、HRP-2, 它们都具有一个相当保守的98个氨基酸长的氨基端序列(Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:26-32, 1997). 在本发明被公布之前,尚没有任何人公开过本申请中涉及的另一个人类HDGF家族成员人HDGF2.

25

30

20

发明概述

本发明的一个目的是提供一种新的多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码 HDGF同源蛋白,本发明的HDGF同源基因被命名为人HDGF2.

本发明的另一个目的是提供一种新的蛋白,该蛋白被命名为人HDGF2.

本发明的再一个目的是提供一种利用重组技术生产所述的新的人HDGF2蛋白的方法.

本发明还提供了这种人HDGF2基因序列和蛋白的应用.



25

30



在本发明的一个方面,提供了一种分离出的DNA分子,它包括:编码具有人HDGF2蛋白活性的多肽的核苷酸序列,所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列有至少70%的同源性;或者所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列杂交. 较佳地,所述的序列编码一多肽,该多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列. 更佳地,该序列具有SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列。

在本发明的另一方面,提供了一种分离的HDGF2蛋白多肽,它包括:具有SEQ ID NO: 4氨基酸序列的多肽、或其活性片段,或其活性衍生物。较佳地,该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列的多肽。

在本发明的另一方面,提供了一种载体,它含有上述分离出的DNA.

在本发明的另一方面,提供了一种所述载体转化的宿主细胞.

在本发明的另一方面,提供了一种产生具有HDGF2蛋白活性的多肽的方法,该方法包括:

- 15 (a)将编码具有HDGF2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,形成HDGF2蛋白表达载体,所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列有至少70%的同源性;
 - (b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞, 形成HDGF2蛋白的重组细胞;
 - (c)在适合表达HDGF2蛋白多肽的条件下, 培养步骤(b)中的重组细胞;
- 20 (d)分离出具有HDGF2蛋白活性的多肽.

在本发明的一个具体实施方案中,本发明的分离的多核苷酸全长为1024个核苷酸,其详细序列见SEQ ID NO: 3,其中开放读框位于121-732位核苷酸.

在本发明中, "分离的"、"纯化的"或"基本纯的"DNA是指,该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来,还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开,而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

在本发明中,术语"HDGF2蛋白(或多肽)编码序列"指编码具有HDGF2蛋白活性的多肽的核苷酸序列,如SEQ ID NO: 3中121-732位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指,位于SEQ ID NO: 3序列的编码框121-732位核苷酸中,有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性,所以与SEQ ID NO: 3中121-732位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO: 4所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下,更佳地,在高度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序

20

25

30

列杂交的核苷酸序列. 此外,该术语还包括与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列的同源性至少70%,较佳地至少80%,更佳地至少90%的核苷酸序列.

该术语还包括能编码具有与人HDGF2相同功能的蛋白的、SEQ ID NO: 3中开放读框序列的变异形式. 这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1-90个, 较佳地1-60个, 更佳地1-20个, 最佳地1-10个)核苷酸的缺失、插人和/或取代, 以及在5 和/或3 端添加数个(通常为60个以内, 较佳地为30个以内, 更佳地为10个以内, 最佳地为5个以内)核苷酸.

在本发明中, "基本纯的"蛋白质或多肽是指其至少占样品总物质的至少 10 20%, 较佳地至少50%, 更佳地至少80%, 最佳地至少90%(按干重或湿重计). 纯度可以用任何合适的方法进行测量, 如用柱层析、PAGE或HPLC法测量多肽的纯度. 基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分.

在本发明中,术语"HDGF2蛋白多肽"指具有HDGF2蛋白活性的SEQ ID NO: 4序列的多肽.该术语还包括具有与人HDGF2相同功能的、SEQ ID NO: 4序列的变异形式.这些变异形式包括(但并不限于):若干个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插人和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸.例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能.又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能.该术语还包括HDGF2蛋白的活性片段和活性衍生物.

该多肽的变异形式包括: 同源序列、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与HDGF2 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗HDGF2多肽的抗血清获得的多肽或蛋白. 本发明还提供了其他多肽, 如包含HDGF2多肽或其片段的融合蛋白. 除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了HDGF2多肽的可溶性片段. 通常, 该片段具有HDGF2多肽序列的至少约10个连续氨基酸, 通常至少约30个连续氨基酸, 较佳地至少约50个连续氨基酸, 更佳地至少约80个连续氨基酸, 最佳地至少约100个连续氨基酸.

发明还提供HDGF2蛋白或多肽的类似物.这些类似物与天然HDGF2多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之.这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体.诱导变异体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或

20

25

30



其他已知分子生物学的技术,类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如β、γ-氨基酸)的类似物,应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽.

修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化.修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽.这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成.修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列.还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽.

本发明还包括HDGF2多肽编码序列的反义序列. 这种反义序列可用于抑制细胞内HDGF2的表达.

本发明还包括可用作探针和引物的核酸分子,该分子通常具有HDGF2多肽编码序列的8-100个,较佳地15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码HDGF2的核酸分子。

15 本发明还包括检测HDGF2核苷酸序列的方法,它包括用上述的探针与样品进行杂交,然后检测探针是否发生了结合.较佳地,该样品是PCR扩增后的产物,其中PCR扩增引物对应于HDGF2多肽的编码序列,并可位于该编码序列的两侧或中间,引物长度一般为20-50个核苷酸.

在本发明中, 可选用本领域已知的各种载体, 如市售的载体.

在本发明中,术语"宿主细胞"包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞,昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地,该宿主细胞是真核细胞,如CHO细胞、COS细胞等。

另一方面,本发明还包括对HDGF2 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体,尤其是单克隆抗体。这里,"特异性"是指抗体能结合于HDGF2基因产物或片段. 较佳地,指那些能与HDGF2基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体. 本发明中抗体包括那些能够结合并抑制HDGF2蛋白的分子,也包括那些并不影响HDGF2蛋白功能的抗体. 本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的HDGF2基因产物结合的抗体.

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体,而且还包括具有免疫活性的抗体片段,如Fab'或(Fab)2片段;抗体重链;抗体轻链;遗传工程改造的单链Fv分子(Ladner等人,美国专利No. 4,946,778);或嵌合抗体,如具有鼠抗体结合特异性但

15

20

25

30



仍保留来自人的抗体部分的抗体.

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如、纯化的HDGF2基因产物或者其具有抗原性的片段,可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达HDGF2或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见Kohler 等人,Nature 256;495, 1975; Kohler 等人,Eur. J.Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人,Eur.J.Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人,In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断HDGF2功能的抗体以及不影响HDGF2功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用HDGF2基因产物的片段或功能区,通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与HDGF2基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如E. Coli)中生产的基因产物来免疫动物而产生;与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽),可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

本发明的人HDGF2核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列.这通常是将其克隆人载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列.

此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时,通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段,目前,已经可以完全通过化学合成来编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中,

除了用重组法产生之外,本发明蛋白的片段还可用固相技术,通过直接合成 肽而加以生产(Stewart 等人,(1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J. (1963) J. Am Chem. Soc 85: 2149-2154). 在体外合成蛋白质可以用手工或自动进行. 例如,可以用 Applied Biosystems 的 431A 型肽合成仪(Foster City, CA)来自动合成肽. 可以分别化学合成本发明蛋白的各片段,然后用化学方法加以连接以产生全长的分子.

15

20

25

30



本发明蛋白的编码序列还可用于基因定位。例如,通过荧光原位杂交技术 (FISH), 将 cDNA 克隆与分裂中期的染色体进行杂交, 可以准确地进行染色体定位。该技术可以使用短至约 500bp 的 cDNA; 也可以使用长至约 2000bp 或者更长的 cDNA. 对于该技术,可参见 Verma 等人, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988).

一旦序列被定位于染色体上的某个精确位置,将可以将序列在染色体上的物理位置与遗传图谱数据相关联.这些遗传图谱数据是可以获得的,例如通过孟德尔(Mendelian)人遗传数据库(可通过 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在网上获得). 然后,通过连锁分析来鉴定基因与已定位于同一染色体区域的疾病之间的相关性.

接着,有必要确定患病个体和健康个体之间的 cDNA 或基因组序列方面的差异. 如果某一突变存在于部分或全部患病个体但不存在于正常个体,那么该突变可能就是该疾病的致病因素.

利用本发明蛋白,通过各种常规筛选方法,可筛选出与 HDGF2 发生相互作用的物质,如受体、抑制剂或拮抗剂等.

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、拮抗剂或受体等,当在治疗上进行施用(给药)时,可提供不同的效果。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中 pH 通常为约 5 - 8 , 较佳地 pH 约为 6 - 8 ,尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于): 肌内、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

以本发明的人 HDGF2 蛋白为例,可以将其与合适的药学上可接受的载体联用.这类药物组合物含有治疗有效量的蛋白质和药学上可接受的载体或赋形剂.这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合. 药物制剂应与给药方式相匹配. 本发明的人 HDGF2 蛋白可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备.诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备.药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造.活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1 微克/千克体重-约5 毫克/千克体重.此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用.

当本发明的人 HDGF2 蛋白多肽被用作药物时,可将治疗有效剂量的该多肽施用于哺乳动物,其中该治疗有效剂量通常至少约 10 微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重,较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重 - 约



1毫克/千克体重. 当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的.

附图简述

5

15

20

25

30

在附图中,图1为本发明HDGF2与小鼠HDGF2的核酸序列的同源比较图.其中,相同的核苷酸用"|"标出.

图2为本发明HDGF2与小鼠HDGF2的氨基酸序列的同源比较图. 其中, 相同的氨基酸用"]"标出, 相似的氨基酸用"。"标出.

在本发明的一个实例中, 人HDGF2的 cDNA核苷酸序列是如此获得的, 以人睾丸 λ gtllcDNA 文库(购自 Clontech 公司)为模板, 合成正向引物 A1: 5'-ACCGCTCGTCCGCCCGGCTTGAG-3' 和 反 向 引 物 A2: 5'-GATCCTAGACATGTATAAGTCTGCG C-3', 进行PCR, 分别获得1024bp的目的片段, 测序后得到SEQ ID NO: 3的全长cDNA序列.

肝癌细胞衍生生长因子(HDGF)是从人的肝癌细胞株HuH-7中分离到的肝素 结合蛋白,它具有刺激细胞生长的活性,能够促进成纤维细胞和一些肝癌细胞的生 长(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994), 它在人的心、脑、肺、肝等各个 组织及各种癌细胞株中均有表达 (J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994). HDGF家族的已知各成员的表达模式是不同的,但是它们在精巢中都有很高程度 的富集, 而且它们的5 非翻译区均有高于70%的GC比(Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:26-32, 1997), 因而可能在雄性生殖细胞发育过程中有重要功能, 并和DNA甲基化, 染色质构象以及翻译调控相关(J. Cell. Biol. 115:887-903, 1990; Cell 62:503-514, 1990). 尽管HDGF蛋白主要存在于细胞质(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994), 但是该家族成员的氨基酸序列中都含有一个潜在的 核定位信号(NLS),并且都无信号肽顺序,提示它们可能作为核蛋白起作用.另 外,HDGF的C端的酸性氨基酸尾和HMG家族的HMG-1/-2高度同源,而这段序列 在HMG-1/-2中已知是组蛋白结合区域(Biochemistry 29:4419-4423, 1990). 很有可 能HDGF在内化后作为转录因子发挥其刺激细胞生长的活性(Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:26-32, 1997). HDGF的有丝分裂原活性使其在急性恶性肝炎和 肝损伤的治疗上存在着极大的应用价值(Clin. Chim. Acta. 183:273-284, 1989)。研 究表明, 许多成纤维细胞生长因子能够广泛应用于局部缺血症及动脉粥样硬化症 等血管形成方面有缺陷的疾病以及神经细胞的发育(Blood 91(10):3527-3561,

1998; Ann. N. Y. Acad. Sci. 545:240-252, 1998).





下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

实施例

实施例1

HDGF2的cDNA序列的克隆和测定

1. 引物扩增

10

15

20

以人睾丸 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板, 用寡核苷酸A1: 5'-ACCGCTCGTCCGCCCGGCTTGAG-3' (SEQ ID NO: 1)为正向引物, 寡核苷酸A2: 5'-GATCCTAGACATGTATAAGTCTGCGC-3' (SEQ ID NO: 2)为反向引物, 进行PCR, PCR条件为93℃4分钟, 随之以93℃1分钟、68.5℃1分钟和72℃1分钟进行35个循环, 最后72℃延伸5分钟. 电泳检测得到的PCR片段, 为1024bp的目的片段.

2. PCR产物的测序

将如上获得的PCR扩增产物与pGEM-TTM载体(Promega)连接,转化大肠杆菌 JM103, 用QIAprep Plasmid试剂盒(QIAGEN)提取质粒, 用双链嵌套式缺失试剂盒 (Pharmacia)对插入片段进行定向系列缺失, 然后用PCR对缺失子进行快速鉴定及排序. 用SequiTherm EXCELTM DNA测序试剂盒(Epicentre Technologies)对依次截短的缺失子进行测序, 最后用电脑软件拼接顺序, 获得全长cDNA序列, 共1024bp, 详细序列见SEQ ID NO: 3, 其中开放读框位于121-732位核苷酸.

根据得到的全长cDNA序列推导出HDGF2的氨基酸序列,共203个氨基酸残25 基,其氨基酸序列详见SEQ ID NO: 4.

实施例2

同源比较

用人HDGF2的全长cDNA序列及其编码蛋白在Non-redundant GenBank+30 EMBL +DDBJ+PDB数据库及Non-redundant GenBank CDS translations+PDB +SwissProt+Spupdate+PIR数据库中用BLAST进行核酸和蛋白同源检索。结果发现它们与小鼠HDGF(dbj|D63707|MUSHDGF)基因及其编码蛋白具有极高同源性,用

15

20

25

30



PCGENE软件比较发现,它们在核酸水平上的同一性达到了68.7%,在蛋白水平上的同一性达到了53.7%,并还有9.4%的氨基酸相似(图1和图2). 特别是在保守的由98个氨基酸所构成的氨基末端,与小鼠HDGF的同源性高达90%. 此外,人HDGF2和另一个小鼠HDGF基因(dbj|D63850|D63850)以及另一个人的HDGF基因(dbj|D16431|HUMHDGF)也有一定的同源性. 上述这些基因被认为构成一个家族,所以可以从已知的这些基因或蛋白的功能来推测人HDGF2的功能.

肝癌细胞衍生生长因子(HDGF)是从人的肝癌细胞株HuH-7中分离到的肝素结合蛋白,它具有刺激细胞生长的活性,能够促进成纤维细胞和一些肝癌细胞的生长(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994). 尽管HDGF最初在肝癌细胞中被发现,但Northern杂交分析显示它在人的心、脑、肺、肝等各个组织及各种癌细胞株中均有表达. 它在正常细胞和肿瘤细胞中是否存在着表达差异,还需进一步实验证明(J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994). 随着研究的深入,HDGF在肝癌细胞中的作用及其对肝癌治疗的影响也会不断被揭示. HDGF家族已知各成员的表达模式是不同的,但是它们在精巢中都有很高程度的富集,而且这些基因的5 非翻译区均有高于70%的GC比(Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:26-32, 1997), 这个特点和一些在精巢或胚胎发育中特异表达的基因相类似,因而它们可能在雄性生殖细胞发育过程中有重要功能,并和DNA甲基化,染色质构象以及翻译调控相关(J. Cell. Biol. 115:887-903, 1990; Cell 62:503-514, 1990).

荧光免疫实验显示 HDGF蛋白主要存在于细胞质 (J. Biol. Chem. 269(40):25143-25149, 1994), 但是该家族成员的氨基酸序列中都含有一段碱性区域——一个潜在的核定位信号(NLS), 并且都无信号肽顺序, 提示它们可能作为核蛋白起作用. 成纤维细胞生长因子(FGF)必须依靠这段信号区域, 使之定位于核内而发挥其有丝分裂原的活性. 另外, HDGF的C端的酸性氨基酸尾和HMG家族的HMG-1/-2高度同源, 而这段序列在HMG-1/-2中已知是组蛋白结合区域(Biochemistry 29:4419-4423, 1990). 综合上述现象, 很有可能HDGF在内化后作为转录因子发挥其刺激细胞生长的活性(Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:26-32, 1997). 本发明的HDGF2也同样具有类似活性.

HDGF的有丝分裂原活性使其在急性恶性肝炎和肝损伤的治疗上存在着极大的应用价值(Clin. Chim. Acta. 183:273-284, 1989). 研究表明,许多成纤维细胞生长因子具有促进上皮细胞生长的能力,能够广泛应用于局部缺血症及动脉粥样硬化症等血管形成方面有缺陷的疾病以及神经细胞的发育(Blood 91(10):3527-3561, 1998; Ann. N. Y. Acad. Sci. 545:240-252, 1998). I型HDGF及本发明HDGF2



的在促成纤维细胞生长活性方面的应用尚有待于进一步研究.

本发明的HDGF2除了可作为该家族一员用于进一步的功能研究,还可用于与其他蛋白一起产生融合蛋白,比如与免疫球蛋白一起产生融合蛋白。此外,本发明HDGF2还可以与该家族的其他成员进行融合或交换片段,以产生新的蛋白,如将本发明HDGF2的N端与I型HDGF或鼠HDGF的N端进行交换,以产生新的活性更高或具有新特性的蛋白.

针对本发明HDGF2的抗体,用于筛选该家族的其他成员,或者用于亲和纯化相关蛋白(如该家族的其他成员).

10 实施例3

15

25

HDGF2在大肠杆菌中的表达

在该实施例中,将编码HDGF2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物进行扩增,获得HDGF2 cDNA作为插人片段.

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

5 -CCACGGATCCATGGCGCGTCCGCGGCCCC-3'(SEQ ID NO: 5)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点,在该酶切位点之后是由起始密码子开始的HDGF2编码序列的19个核苷酸;

3'端引物序列为:

5 -ATCCGTCGACTTAGGTCCCTTCACTGGTT-3 (SEQ ID NO: 6)

20 该引物含有Sall限制性内切酶的酶切位点、翻译终止子和HDGF2的部分编码 序列。

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体pQE-9(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)上的限制性内切酶酶切位点,该质粒载体编码抗生素抗性 (Amp^r)、一个细菌复制起点(ori)、一个IPTG-可调启动子/操纵子(P/O)、一个核糖体结合位点(RBS)、一个6-组氨酸标记物(6-His)以及限制性内切酶克隆位点.

用BamHI和Sall消化pQE-9载体及插入片段,随后将插入片段连接到pQE-9载体并保持开放读框在细菌RBS起始。随后用连接混合物转化购自Qiagen,商品名为M15/rep4的E.coli菌株,M15/rep4含有多拷贝的质粒pREP4,其表达lacl阻遏物并携带卡那霉素抗性(Kan^T)。在含有Amp和Kan的LB培养皿上筛选转化子,抽提质粒,用PstI酶切鉴定插入片段大小及方向,并测序验证HDGF2的cDNA片段已正确插入了载体。

在补加Amp(100 μ g/ml)和Kan(25 μ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)



含所需构建物的阳性转化子克隆. 过夜(O/N)培养物以1: 100-1: 250的稀释率稀释, 然后接种到大体积培养基中, 培养细胞生长至600光密度(OD₆₀₀)为0.4-0.6时, 加人IPTG("异丙基硫代-β-D-半乳糖苷")至终浓度为1mM. 通过使lacI阻遏物失活, IPTG诱导启动P/O导致基因表达水平提高. 继续培养细胞3-4小时, 随后离心(6000×g, 20分钟). 超声裂解培养物, 收集细胞裂解液并将其稀释于6M的盐酸胍中. 澄清后, 通过在能使含6-His标记物蛋白紧密结合的条件下, 用镍-螯合柱层析从溶液中纯化溶解的HDGF2. 用6M盐酸胍(pH5.0)从柱中洗脱HDGF2. 可用几种方法从盐酸胍中变性沉淀蛋白. 或者使用透析步骤除去盐酸胍,或者从镍-螯合柱中分离出纯化蛋白,纯化后的蛋白可以结合到第二个柱中,该柱中具有递

减的线性盐酸胍梯度. 在结合到该柱时蛋白质变性, 随后用盐酸胍(pH5.0)洗脱. 最后, 将可溶的蛋白质对含PBS进行透析,然后将蛋白质保存在终浓度为10%(w/v) 甘油的贮存液中.

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳,鉴定表达蛋白的分子量大小为约23KDa. 此外,用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行 测序,发现与SEQ ID NO: 4的序列一致.

实施例4

10

15

25

HDGF2在真核细胞(CHO细胞株)中的表达

在该实施例中, 将编码HDGF2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的 20 PCR募核苷酸引物进行扩增, 获得HDGF2 cDNA作为插入片段.

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

5 -CCCTAAGCTTATGGCGCGTCCGCGGCCCC-3'(SEQ ID NO: 7)

该引物含有HindIII限制性内切酶的酶切位点,在该酶切位点之后是由起始密码子开始的HDGF2编码序列的19个核苷酸;

3'端引物序列为:

5 - TTTCGGATCCTTAGGTCCCTTCACTGGTT-3 (SEQ ID NO: 8)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止子和HDGF2的部分编码序列。

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于CHO细胞表达载体pcDNA3上的限 30 制性内切酶酶切位点,该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r和Neo^r)、一个噬菌体复制起点(fl ori)、一个病毒复制起点(SV40 ori)、一个T7启动子、一个病毒启动子(P-CMV)、一个Sp6启动子、一个SV40启动子、一个SV40加尾信号和相应的polyA



顺序、一个BGH加尾信号和相应的polyA顺序.

用HindIII和BamHI消化pcDNA3载体及插入片段,随后将插入片段连接到pcDNA3载体。随后用连接混合物转化*E.coli* DH5α菌株。在含有Amp的LB培养皿上筛选转化子,在补加Amp(100μg/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的克隆。抽提质粒,用PstI酶切鉴定插入片段大小及方向,并测序验证HDGF2的cDNA片段已正确插入了载体。

质粒转染CHO细胞是用脂转染法,用Lipofectin试剂盒(GiBco Life)进行.转染48小时后,经2-3周的持续G418加压筛选,收集细胞及细胞上清测定表达蛋白酶活力.去G418,连续传代培养;对混合克隆细胞极限稀释,选择具有较高蛋白活性的细胞亚克隆.按常规方法大量培养上述阳性亚克隆.48小时后,开始收集细胞及上清,用超声裂解方法破碎细胞.以含0.05%Triton的50mMTris·HCl(pH7.6)溶液为平衡液及洗脱液,用经预平衡的Superdex G-75柱收集上述蛋白的活性峰.再用50mMTris·HCl(pH8.0)平衡的DEAE-Sepharose柱,以含0-1M NaCl的50mMTris·HCl(pH8.0)溶液为洗脱液进行梯度洗脱,收集上述蛋白的活性峰.然后以PBS(pH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析.最后冻干保存.

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳,鉴定表达蛋白的分子量大小为23KDa.,

此外,用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序,发现与SEQ ID NO: 4的序列一致.

20 实施例5

10

15

25

制备抗体

将实施例3和4获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体,具体如下.重组分子用层析法进行分离后备用.也可用SDS-PAGE凝胶电泳法进行分离,将电泳条带从凝胶中切下,并用等体积的完全Freund s佐剂乳化.用50-100 μ g/0.2ml乳化过的蛋白,对小鼠进行腹膜内注射.14天后,用非完全Freund s佐剂乳化的同样抗原,对小鼠以50-100 μ g/0.2ml的剂量进行腹膜内注射以加强免疫.每隔14天进行一次加强免疫,至少进行三次.获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀HDGF2基因翻译产物的能力加以评估.

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被 30 单独引用作为参考那样,此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本 领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所 附权利要求书所限定的范围.



序列 表

-	(1)一般信息:	
5	(ii)发明名称: 新的人肝癌细胞衍生生长因子编码序列、 其编码的多肽及制备方法	
	(iii)序列数目: 8	
10		
	(2)SEQ ID NO: 1的信息	
	(i)序列特征	
	(A)长度: 23碱基	
	(B)类型: 核酸	
15	(C)链性: 单链	
	(D)拓扑结构: 线性	
	(ji)分子类型: 寡核苷酸	
	(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1	
	ACCGCTCGTC CGCCCGGCTT GAG	23
20		
	(2)SEQ ID NO: 2的信息	
	(i)序列特征	
	(A)长度: 26碱基	
	(B)类型: 核酸	
25	(C)链性: 单链	
	(D)拓扑结构: 线性	
	(ii)分子类型: 寡核苷酸	
	(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2	
	GATCCTAGAC ATGTATAAGT CTGCGC	26
30		
	(2)SEQ ID NO: 3的信息:	
	(i)序列特征	

(A)长度: 1024bp



(B)类型: 核酸

(C)链性: 双链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3

1 ACCGCTCGTC CGCCCGGCTT GAGGCCCGCG GGGAGCGCGC GCAATTCGTC GGCCCGCGGG 61 GGGGCGCCT CCCGGCATCT TCGCGGCGAC CAAGGACTAC CAGGAAGGGG AGCGGCTGGG 121 ATGGCGCGTC CGCGGCCCCG CGAGTACAAA GCGGGCGACC TGGTCTTCGC CAAGATGAAG 181 GGCTACCCGC ACTGGCCGGC CCGGATTGAT GAACTCCCAG AGGGCGCTGT GAAGCCTCCA 10 241 GCAAACAAGT ATCCTATCTT CTTTTTTGGC ACCCATGAAA CTGCATTTCT AGGTCCCAAA 301 GACCTTTTTC CATATAAGGA GTACAAAGAC AAGTTTGGAA AGTCAAACAA ACGGAAAGGA 361 TTTAACGAAG GATTGTGGGA AATAGAAAAT AACCCAGGAG TAAAGTTTAC TGGCTACCAG 421 GCAATTCAGC AACAGAGCTC TTCAGAAACT GAGGGAGAAG GTGGAAATAC TGCAGATGCA 481 AGCAGTGAGG AAGAAGGTGA TAGAGTAGAA GAAGATGGAA AAGGCAAAAG AAAGAATGAA 15 541 AAAGCAGGCT CAAAACGGAA AAAGTCATAT ACTTCAAAGA AATCCTCTAA ACAGTCCCGG 601 AAATCTCCAG GAGATGAAGA TGACAAAGAC TGCAAAGAAG AGGAAAACAA AAGCAGCTCT 661 GAGGGTGGAG ATGCGGGCAA CGACACAAGA AACACAACTT CAGACTTGCA GAAAACCAGT 721 GAAGGGACCT AACTACCATA ATGAATGCTG CATATTAAGA GAAACCACAA GAAGGTTATA 781 TGTTTGGTTG TCTAATATTC TTGGATTTGA TATGAACCAA CACATAGTCC TTGTTGTCAT 20 841 TGACAGAACC CCAGTTTGTA TGTACATTAT TCATATTCCT CTCTGTTGTG TTTCGGGGGG 901 AAAAGACATT TTAGCCTTTT TTAAAAGTTA CTGATTTAAT TTCATGTTAT TTGGTTGCAT 961 GAAGTTGCCC TTAACCACTA AGGATTATCA AGATTTTTGC GCAGACTTAT ACATGTCTAG 1021 GATC

25

30

(2)SEQ ID NO: 4的信息:

(i)序列特征

(A)长度: 203个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型: 多肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4



1 Met Ala Arg Pro Arg Pro Arg Glu Tyr Lys Ala Gly Asp Leu Val 16 Phe Ala Lys Met Lys Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Ile Asp 31 Glu Leu Pro Glu Gly Ala Val Lys Pro Pro Ala Asn Lys Tyr Pro 46 Ile Phe Phe Phe Gly Thr His Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys 61 Asp Leu Phe Pro Tyr Lys Glu Tyr Lys Asp Lys Phe Gly Lys Ser 76 Asn Lys Arg Lys Gly Phe Asn Glu Gly Leu Trp Glu Ile Glu Asn 91 Asn Pro Gly Val Lys Phe Thr Gly Tyr Gln Ala Ile Gln Gln Gln 106 Ser Ser Ser Glu Thr Glu Gly Glu Gly Gly Asn Thr Ala Asp Ala 121 Ser Ser Glu Glu Glu Gly Asp Arg Val Glu Glu Asp Gly Lys Gly 136 Lys Arg Lys Asn Glu Lys Ala Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Tyr 151 Thr Ser Lys Lys Ser Ser Lys Gln Ser Arg Lys Ser Pro Gly Asp 166 Glu Asp Asp Lys Asp Cys Lys Glu Glu Glu Asn Lys Ser Ser Ser 181 Glu Gly Gly Asp Ala Gly Asn Asp Thr Arg Asn Thr Thr Ser Asp 196 Leu Gln Lys Thr Ser Glu Gly Thr

15

10

5

(2)SEQ ID NO: 5的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

20 (C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5

CCACGGATCC ATGGCGCGTC CGCGGCCCC 29

25

30

(2)SEQ ID NO: 6的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸



(xi)序列描述:	SEQ	ID	NO:	6
-----------	-----	----	-----	---

ATCCGTCGAC TTAGGTCCCT TCACTGGTT

29

(2)SEQ ID NO: 7的信息

5 (i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

10 (ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7

CCCTAAGCTT ATGGCGCGTC CGCGGCCCC

29

(2)SEQ ID NO: 8的信息

15 (i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

20 (ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8

TTTCGGATCC TTAGGTCCCT TCACTGGTT 29

25

30

权 利 要 求 书

1. 一种分离出的DNA分子, 其特征在于, 它包括: 编码具有人HDGF2蛋白活性的多肽的核苷酸序列,

所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列有至少70%的同源性;或者

所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732 位的核苷酸序列杂交.

- 2.如权利要求1所述的DNA分子,其特征在于,所述的序列编码一多肽,该 10 多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列.
 - 3.如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 该序列具有SEQ ID NO: 3中核苷酸121-732位的序列.
 - 4.一种分离的HDGF2蛋白多肽,其特征在于,它包括:具有SEQ ID NO:4氨基酸序列的多肽、或其活性片段,或其活性衍生物.
- 5.如权利要求4所述的多肽, 其特征在于, 该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列的 多肽.
 - 6.一种载体, 其特征在于, 它含有权利要求1所述的DNA.
 - 7.一种用权利要求6所述载体转化的宿主细胞,
 - 8.如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是大肠杆菌.
- 20 9.如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是真核细胞.
 - 10.一种产生具有HDGF2蛋白活性的多肽的方法, 其特征在于, 该方法包括:
 - (a)将编码具有HDGF2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,形成HDGF2蛋白表达载体,所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位的核苷酸序列有至少70%的同源性;
 - (b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞,形成HDGF2蛋白的重组细胞;
 - (c)在适合表达HDGF2蛋白多肽的条件下,培养步骤(b)中的重组细胞;
 - (d)分离出具有HDGF2蛋白活性的多肽.
 - 11.如权利要求10所述的方法,其特征在于,该序列为SEQ ID NO: 3中从核苷酸121-732位。
 - 12.一种能与权利要求4所述的HDGF2蛋白多肽特异性结合的抗体.
 - 13.一种核苷酸分子, 其特征在于, 它是权利要求1所述DNA分子的反义序列。
 - 14.一种探针分子, 其特征在于, 它含有权利要求1所述的 DNA 分子中约 8-100 个连续核苷酸.



÷

4





人 HUGF Z 核酸	- ACCOLICOTOCOCO TOAGO COCOCOCO ATTECT - 30
小鼠 HDGF 核酸	- CGCAAAC-TTG -10
人 HDGF2 核酸	- GGCCCGCGGGGGGCGCCTCCCGGCATCTTCGCGGCGACCAAGGACTAC -10
小鼠 HDGF 核酸	- GGCTCGCGCTTCCCGGCT-CGGCGCGGAGCCCGG-GGCGCC -49
人 HDGF2 核酸	- CAGGAAGGGAGCGGCTGGGATGGCGCG-TCCGCGGCCCCGCGAGTAC -14
小鼠 HDGF 核酸	- CGCGGCCCCGCCATGTCGCGATCCAACCGGCAGAAAGAGTAC -91
人 HDGF2 核酸	- AAAGCGGGCGACCTGGTCTTCGCCAAGATGAAGGGCTACCCGCACTGGCC -197
小鼠 HDGF 核酸	- AAGTGCGGAGACCTGGTGTTTGCGAAGATGAAAGGATACCCACACTGGCC -14
人 HDGF2 核酸	- GGCCCGGATTGATGAACTCCCAGAGGGCGCTGTGAAGCCTCCAGCAAACA -247
小鼠 HDGF 核酸	- GGCCCGGATTGATGAGATGCCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACA -191
人 HDGF2 核酸	- AGTATCCTATCTTCTTTTTGGCACCCATGAAACTGCATTTCTAGGTCCC -297
小鼠 HDGF 核酸	- AATACCAAGTCTTTTTTTTGGGACCCATGAGACGGCATTCCTGGGCCCC - 241
人 HDGF2 核酸	- AAAGACCTTTTTCCATATAAGGAGTACAAAGACAAGTTTGGAAAGTCAAA -347
小鼠 HDGF 核酸	- AAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAGAAGTTTGGCAAGCCCAA -291
人 HDGF2 核酸	- CAAACGGAAAGGATTTAACGAAGGATTGTGGGAAATAGAAAATAACCCAG -397
小鼠 HDGF 核酸	- CAAGAGGAAAGGGTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAACAACCCTA -341
人 HDGF2 核酸	- GAGTAAAGTTTACTGGCTACCAGGCAATTCAGCAACAGAGCTCTTCA -444
小鼠 HDGF 核酸	
人 HDGF2 核酸	- GAAACTGAGGGAGAAGGTGGAAATAC470
小鼠 HDGF 核酸	- GAGCCCGAGGTGGAGCCCGAAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGG -441
、HDGF2 核酸	TGCAGATGCAAGCAGTGAGGAAGAAGGTGATAGAGTA507
、鼠 HDGF 核酸	- CAGTGCAGAGGCAGCAGCGACGAAGAAGGGAAACTGGTGATCGATGAAC -491

.



人 HDGF2 核酸	GAAGAAGATGGAAAAGGCAAAAGAA-AGAAT -537
小鼠 HDGF 核酸	- CAGCCAAGGAGAAGAACGAAAAGGGCACGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGAT -541
人 HDGF2 核酸	- GGGA -559
小鼠 HDGF 核酸	- GTGTTGGAGGACTCCCCTAAACGTCCCAAGGAGTCAGGAGACCATGAGGA -591
人 HDGF2 核酸	- AAAAGTCATATACTTCA
小鼠 HDGF 核酸	- GGAGGACAAGGAGATAGCTGCCTTGGAGGGTGAGAGGCACCTGCCTG
人 HDGF2 核酸	AAGAA-ATCCTCTAAAC-AGTCCCGGAAATCT -606
小鼠 HDGF 核酸	- AGGTGGAGAAGAACAGCACCCCCTCTGAGCCAGACTCTGGCCAGGGACCT -691
人 HDGF2 核酸	- CCAGGAGATGAAGATGACAAAGACTGCAAAG-AAGAGGA -644
小鼠 HDGF 核酸	- CCTGCAGAGGAAGAAGAGGGAGAGGAAGAGGCTGCCAAGGAAGAGGCTGA -741
人 HDGF2 核酸	- AAACAAA -651
小鼠 HDGF 核酸	- AGCCCCAGGCGTCAGAGATCATGAGAGCCTGTAGCCACCAATGTTTCAAG -791
人 HDGF2 核酸	- AGCAGCTGGAGATGCG -675
小鼠 HDGF 核酸	- AGGAGCCCCTGCCCCGTTCCTGCTGCTGTCTGGGTGCTACTGGGGAAACT -841
人 HDGF2 核酸	- GGCAACGACACAAGAAACACAACT699
小鼠 HDGF 核酸	- GGCCATGGCCTGCAAACTGGGAACCCTTTCCCACCCTATTTACCCTACTC -891
人 HDGF2 核酸	TCAGACTTGCAGAAAACC-AGTGAAGGGACCT -730
小鼠 HDGF 核酸	- CCTCACTCACTCTCCTCTAAGCCCACTCCTGGAGAGTGTCTTGGCCCT -941
人 HDGF2 核酸	- AACTACCATA-ATGAATGCTGCATATTAAGAGAAA -764
小鼠 HDGF 核酸	- CACCTCCAGCTCCCTTCCTATATACACCCTGTGCCCCAGGATGAGATGAG -991
人 HDGF2 核酸	- CCACAAGAAGGT-TATATGTTTGGTTGTCTAA -795
小鼠 HDGF 核酸	- GCCTTTGTATCTCTTTACACTTGTTTCCCAGGGTTTCTGCTGGGGTCTAG -1041
人 HDGF2 核酸	- TATGA -805
小鼠 HDGF 核酸	- GCTGCTGTTTCCACCTCTTGACACCTCTGCCCTGCTGCAGGCATTCTAGA -1091 图 1(续)



-



人 HDGF2 核酸	TTTGATATGAACCAACACATAG827
小鼠 HDGF 核酸	- CCTTTGGGGTGGATAGTGGGCAGGAGTGAAAGAATATAAAGGAG -1141
人 HDGF2 核酸	CCTTGTTGTCATTGACAGAACCCCAG854
小鼠 HDGF 核酸	- TGTGGGTTCATGGATGGCATCGTCTACCTGAGCTCCTGTCTCCAGCCCCC -1191
人 HDGF2 核酸	TTTGTATGTACATT
小鼠 HDGF 核酸	
人 HDGF2 核酸	
小鼠 HDGF 核酸	- AGAGGCTACCATCCATAAATCCTTGTTGATTTTTGGGAACACTTAT -1291
人 HDGF2 核酸	
小鼠 HDGF 核酸	- CCCCCTGACCCCAGGGTTCAAGGAATTGTAGTTTAACATCTAGACTTTGG -1341
人 HDGF2 核酸	TTTAAAAGTT
小鼠 HDGF 核酸	
人 HDGF2 核酸	ACTGATTTAATTTCATGT-TATTTGGTTGCATGAA963
小鼠 HDGF 核酸	- CAACTGATTTGCATTGAGGAAATGTCTCTTTAGATCTCAGGGCAGAAATG -1441
人 HDGF2 核酸	GTTGCCCTTAACCACTAAGGATTATC -989
小鼠 HDGF 核酸	- ATAACCTGGGGAGACCTGETGCCTTCATCTACTTCCCAATGCTTGAGGCC -1491
人 HDGF2 核酸	- ACATGTCT1018
小鼠 HDGF 核酸	
人 HDGF2 核酸	AGGATC -1024
小鼠 HDGF 核酸	- TTAGGAAATGTTTTAATAAAA -1563
同一性: 68.7%	

图 1(续)



.

•

· ·

•

•



人 HDGF2 蛋白	- MARP-RPREYKAGDLVFAKMKGYPHWPARIDELPEGAVKPPANKYPIFFF -49
小鼠 HDGF 蛋白	- MSRSNRQKEYKCGDLVFAKMKGYPHWPARIDEMPEAAVKSTANKYQVFFF -50
人 HDGF2 蛋白	- GTHETAFLGPKDLFPYKEYKDKFGKSNKRKGFNEGLWEIENNPGVKFTGY99
小鼠 HDGF 蛋白	- GTHETAFLGPKDLFPYEESKEKFGKPNKRKGFSEGLWEIENNPTVKASGY -100
人 HDGF2 蛋白	- QAIQQQSSSETEGEGGNTADASSEEEGDRVEEDGKGKRKN -139
小鼠 HDGF 蛋白	- QSSQKKSCAAEPEVEPEAHEGDGDKKGSAEGSSDEEG-KLVIDEPAKEKN -149
人 HDGF2 蛋白	- EKAGSKRKKSYTSKKSSKQSRKSPGDEDD
小鼠 HDGF 蛋白	- EKGTLKRRAGDVLEDSPKRPKESGDHEEEDKEIAALEGERHLPVEVEKNS -199
人 HDGF2 蛋白	KDCKEEENKSSSEGGDAGNDTRNTTSDLQKTSEGT -203
小鼠 HDGF 蛋白	- TPSEPDSGQGPPAEEEEGEEEAAKEEAEAPGVRDHESL -237

同一性: 53.7% 相似性: 9.4%

图 2

•

.

.





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00139

			
A. CL	ASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ⁷ : C12N15/12,C07K14/475	, C12N15/64,C12N1/1	3,C12P21/02
According	to International Patent Classification(IPC) or to both	national classification and IPC	
	ELDS SEARCHED		
Minimum	documentation searched(classification system f	ollowed by classification symb	pols)
		C07K, C12P	
Document	ation searched other than minimum documentation to	the extent that such documents a	re included in the field searched
	CNPAT, Chinese Scien		
Electronic	data base consulted during the international search(na	ame of data base and, where prac-	ticable, search terms used)
	GenBank,EMBL,DDBJ,PDB	3,SwissProt,SPupdate,	PIR,WPI
C. DO	CUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVAN	Т	
Category*	Citation of document, with indication, where	appropriate, of the relevant pass	ages Relevant claim No.
X	JP 6343470 (KISHIMOTO C, SEKISL	I CHEM IND CO LTD)	1,4,6-10,12-14
	20 DEC 1994		
	the whole document, especially Sequi	ence Listing	
Х	JP 9252777 (KISHIMOTO C, SEKISU 30 SEP 1997,	I CHEM IND CO LTD)	1,4,6-10,12-14
	the whole document, especially Seque	ence Listing	
Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family an	nex.
Special of A" document to be of properties of cartier do cumencited to of special redocument means properties of document the priority of the	categories of cited documents: It defining the general state of the art which is not considered particular relevance becoment but published on or after the international filing date on the which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other cason(as specified) interferring to an oral disclosure, use, exhibition or other at published prior to the international filing date but later than ty date claimed citual completion of the international search	"T" later document published after date and not in conflict with the principle or theory underly document of particular relevonsidered novel or cannot be step when the document is tall "Y" document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of particular relevonsidered to involve an incomplete the document of the	tr the international filing date or priority the application but cited to understand ying the invention ance; the claimed invention cannot be e considered to involve an inventive cen alone ance; the claimed invention cannot be exertive step when the document is ther such documents, such combination and in the art
	23 November 1999 (23. 11. 99)	09 DEC 1999	(09 12 99)
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			- / ~ L, J Y)
The Stat	ailing address of the ISA/ te Intellectual Property Office Patent Office to, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China	Authorized officer ZHOU Telephone No. 86-10-6209	1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00139

	uation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevan	nt passages	Relevant to claim N
X	ref NP_004485.1 PHDGF , LOCUS: pHDGF, accession 4758 J. Biol. Chem. 269(40),25143-25149(1994) Nakamura,H., Izumoto,Y. et al "Molecular cloning of complementary DNA for a now hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobil protein"	vel human	1,4,6-10,12-14
	sp P51859 HDGF_MOUSE, LOCUS: HDGF_MOUSE, P51859 Biochem. Biophys. Res. Commun. 238(1), 26-32(1997) Izumoto,Y. et al. "Hepatoma-derived growth factor belongs family in mice showing significant homology in the amino term		1,4,6-10,12-14
	······································	3 €	





国际检索报告

国际申请号 PCT/CN 99/00139

		 	
A. 主题的	分类 IPC ⁷ :C12N15/12,C07K14/475	,C12N15/64,C12N1/13,C12	2P21/02
按照国际专	利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 II		
B. 检索领	过		
检索的最低	限度文献(标明分类体系和分类号)		_
	C12N,0	C07K,C12P	· ·
包含在检索	领域中的除最低限度文献以外的检索文献 CNPAT , 中	文科技期刊光盘	
在国际检索	时查阅的电子数据库(数据库的名称和,如	!果实际可行的,使用的检索词)	
	GenBank,EMBL,DDBJ,PDB	, SwissProt,SPupdate,PIR,	WPI
C. 相关文(4		
类 型*	引用文件,必要时,包括	相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	JP 6343470 (KISHIMOTO C, SEKIS	UI CHEM IND CO LTD)	1,4,6-10,12-14
	1994.12.20		
	全文,特别是序列表		
X	JP 9252777 (KISHIMOTO C, SEKISI	II CHEM IND CO LTD)	1,4,6-10,12-14
^	1997.9.30	of Chew ind Co ETD)	1,4,0-10,12-14
	全文,特别是序列表	•	
			•
□ 其余文件	牛在 C 栏的续页中列出。	见同族专利附件。	
* 引用文件的		"T"在国际申请日或优先权日之后。	
	了一般现有技术、不认为是特别相关的文件 ,但是在国际申请日的同一日或之后公布的	相抵触,但是引用它是为了理解 "X"特别相关的文件,当该文件被	
	要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用	明不能认为是新颖的或不能认	为具有创造性
文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详 "Y"特别相关的文件;当该文件与其他一篇或多篇这类文件; 细说明) 合在一起,这种结合对本领域技术人员是显而易见的。			
	公开、使用、展览或其他手段的文件 青日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件	求保护的发明不能认为具有创 "&"同族专利成员的文件	造性
际检索实际		国际检索报告邮寄日期	
23.	.11月1999 (23.11.99)	09.12.1999(09	9. 12. 99)
]际检索单位:	名称和邮寄地址	受权官员	4.1 4.1 4.2
	、民共和国国家知识产权局专利局 京市海淀区西土城路 6 号(100088)	周莉	17. * 17.
中國40 2貞号:	86-10-62019451	电话号码: 86-10-62093933	TEN (





国际检索报告

国际申请号 PCT/CN99/00139

C(续). 相乡	€文件		
类 型*	引用文件,必要时,包括相关段落的说明		相关的权利要求编号
. X	ref[NP_004485.1 PHDGF], LOCUS: pHDGF, accession J. Biol. Chem. 269(40),25143-25149(1994) Nakamura,H., Izumoto,Y. et al "Molecular cloning of complementary DNA for a novementational derived growth factor. Its homology with high group-1 protein"	el human	1,4,6-10,12-14 -
X	sp P51859 HDGF_MOUSE, LOCUS: HDGF_MOUSE, a P51859 Biochem. Biophys. Res. Commun. 238(1), 26-32(1997) Izumoto,Y. et al. "Hepatoma-derived growth factor belo gene family in mice showing significant homology in the terminus"	ongs to a	1,4,6-10,12-14
·			
		-	